

明 細 書

微生物分離装置

技術分野

- [0001] 本発明は微生物分離装置に係り、特に液中に分散して混入している微生物を1個ずつ分離する場合に好適な微生物分離装置に関する。

背景技術

- [0002] 微生物は飲食物の製造や廃水处理など様々な分野で有効利用されている。微生物は例えば乳酸菌、大腸菌といったようにそれぞれの特徴によって分類されているが、これらの菌をさらに細かく分類することができる。微生物を有効利用する場合、同じグループに属している微生物でも、細かく分類するとそれぞれの能力が異なるため、利用目的に対して最も適した微生物を利用することが好ましい。このためには、それぞれのグループに属する微生物について、最も細かく分類された「株」の段階まで分類し、それぞれの「株」の能力を比較する必要がある。
- [0003] 微生物を一種類の「株」に分ける場合、一般に段階希釈法により手作業で分離作業を行っていた。また、微生物などの粒子を計測する装置として、特許文献1などに記載されている粒子解析装置が知られている。また、微生物を自動的に分離できる装置として、フローサイトメトリー装置が知られている。この装置は微生物を含む試料液に光を照射して、液中の微生物の種別を判別し、下流の分離機構によって目的の微生物を得る装置である(例えば、特許文献2参照)。

- [0004] 特許文献1:特開2000-74816号公報

特許文献2:特開平9-145593号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0005] しかしながら、前記した段階希釈法は能率が悪く、手間と費用に係る割には微生物の分離効果が低い。また、特許文献1などに記載されている粒子解析装置は、粒子の形状や数を計測するだけであり、計測した微生物などの粒子を分離する機能は具備していない。また、特許文献2などに記載されているフローサイトメトリー装置では、

直径が約 $10\mu\text{m}$ を下回る被測定物では検出が難しくなる。このため、蛍光を発する染料を用いて被測定物を染色し、発する蛍光を計測して被測定物を認識することが行われている。ところが、微生物は通常、直径が約 $10\mu\text{m}$ 以下のものが圧倒的に多い。微生物を染色するとその微生物は一般的に死滅するので、分離後にその微生物の能力を調べることができない。すなわち、従来のフローサイトメトリー装置では微生物を生存させたまま分離することが困難であるという問題点があった。

- [0006] 本発明の目的は、上記従来技術の問題点を改善し、試料液中の微生物を能率よく、かつ生存させたまま1個ずつ分離することができる微生物分離装置を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0007] 上記の目的を達成するために、本発明に係る微生物分離装置は、微生物を含む試料液を収容した試料液容器と、前記試料液容器内の試料液を第1流路に供給する試料液供給手段と、前記第1流路を通過する前記試料液中の単体の微生物を検出可能な微生物センサと、前記微生物センサの微生物の検出結果に基づいて前記第1流路への試料液の供給を停止させるとともに前記検出した微生物を試料液とともに前記第1流路の終端側から排出させる試料液分離手段と、前記第1流路の終端側から排出される試料液を受ける受容器とを備えたことを特徴とする。
- [0008] 上記構成の微生物分離装置は、前記第1流路の終端側から排出される試料液が1個の微生物を含むように前記試料液分離手段が制御可能とされたことが好ましい。また、前記第1流路の終端を第2流路の中間に結合し、前記第2流路に前記第1流路の終端側から排出された試料液を搬送するための搬送液を流通可能にするとともに、前記受容器を第2流路の終端側に配置した構成にすることができる。
- [0009] また、前記試料液供給手段にフィルタを設置したことが好ましい。さらに、前記受容器を複数個有し、前記第1流路又は第2流路の終端の試料液排出部と各受容器の位置関係が相対的に移動可能とされた構成にすることができる。又は、前記第2流路の下流側が複数の分岐管に分かれており、各分岐管の下流に前記受容器が配置された構成にすることができる。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、微生物を能率よく高い確率で1個ずつに分離できる。また、約10 μ mを下回る微生物であっても、微生物を生存させたままで1個ずつ分離することができる。このため、分離した微生物の培養に成功すれば容易に当該微生物を単離することができ、当該微生物の能力を評価できるとともに各種産業用として効果的に利用することができる。

発明を実施するための最良の形態

[0011] 図1は本発明に係る微生物分離装置の第1実施形態を示す概略構成図である。微生物分離装置は分離器10と、この分離器10に試料液を供給する試料液供給手段30と、分離器10の終端側に配置された受容器移動機構50とによって構成される。図1において分離器10は断面図として図示されており、分離器10の中心には第1流路12が設けられ、第1流路12の始端には試料液供給手段30から供給された試料液40の流入口14が形成されている。第1流路12の終端は先細部16とされ、この先細部16の上流側と下流側に電極部18, 20が取り付けられている。電極部18, 20は微生物センサ22に接続しており、計測時には直流電流が流れる。微生物センサ22の検出信号はコントローラ24に送信される。分離器10の側部には加振器26が取り付けられ、加振器26はコントローラ24からの信号によって作動が制御される。なお、分離器10はプラスチック又はガラス等の非導電性材料で形成されることが好ましく、電極部18, 20は耐食性、非溶出性が要求されるので金、白金、炭素等のイオン化傾向の低い材料で形成されることが望ましい。

[0012] 試料液供給手段30は主に試料液容器32と、この試料液容器32と分離器10とを結ぶ配管36と、配管36の途中に設けたポンプ34とからなる。ポンプ34はモータによって駆動され、コントローラ24からの信号によってON-OFFが制御される。試料液容器32には微生物を含む試料液40が張り込まれている。ポンプ34の吐出側の配管36には電磁弁38が取り付けられており、この電磁弁38の開閉もコントローラ24からの信号によって制御される。

[0013] 受容器移動機構50は複数の受容器52をピッチPで並べた受台54を備えている。各受容器52の上端は開口しており、第1流路12の終端から滴下してくる試料液40の液滴28を受けることができる。受台54は矢印Aの方向に移動可能とされ、コントロ

ーラ24からの信号によって1ピッチずつ移動可能とされる。

- [0014] 上記の構成において、ポンプ34を駆動し、電磁弁38を開放することによって、試料液容器32内の試料液40が配管36を介して分離器10の流入口14に送り込まれ、第1流路12が試料液40で満たされる。この状態で第1流路12内に取り付けられた電極部18と外部に取り付けた電極部20に通電させると両極間の試料液40の電気抵抗が微生物センサ22によって計測される。試料液40は微生物を含んでおり、この微生物が先細部16を通過すると両極間の電気抵抗が変化する。したがって、微生物センサ22では両極間の電気抵抗の変化を計測することによって、微生物が先細部16を通過したことを検知することができる。本発明者の知見によれば、先細部16の最狭断面寸法に対して、微生物の外形寸法が2%以上である時には、微生物の通過による両極間の電気抵抗が変化を明確に識別することができる。微生物の外形寸法は1〜5 μm が一般的であるから、先細部16の最狭断面寸法を10〜50 μm 程度にすると微生物センサ22による微生物の検知を確実に行うことができ、また、先細部16の最狭断面部を微生物が円滑に通過することができる。
- [0015] 微生物センサ22による微生物の検出信号は直ちにコントローラ24に送信される。コントローラ24は微生物の検出信号に基づいて、まず、ポンプ34を停止させる。すると、第1流路12内での試料液40の流れが停止し、図1に図示したように、第1流路12の終端に試料液40の液滴28がぶら下がった状態となり、通常はこの液滴28の中に微生物が1個だけ存在する。この状態でコントローラ24からの信号によって加振器26を作動させる。すると、分離器10が振動して、液滴28が第1流路12の終端から強制的に切り離される。切り離された液滴28は直下位置に待機している受容器52内に落下する。その結果、受容器52内には微生物が1個だけ存在する試料液40の液滴28が収容されることになり、微生物を生存させたままで1個ずつ分離することができる。
- [0016] 上記の操作によって微生物1個の分離が終了すると、コントローラ24は加振器26の作動を停止させるとともに、受台54に駆動信号を送信し受台54を矢印Aの方向に1ピッチ移動させて、次の受容器52を第1流路12の終端に待機させる。次に、ポンプ34を再駆動させる。すると、第1流路12内に試料液40が再び流れ出し、次の微生物が先細部16を通過するまでは微生物が存在しない試料液40を待機している受容器

52に排出する。以下、同様の操作を繰り返すことによって、微生物を1個ずつ確実に分離していく。

[0017] 上述のとおり、本実施形態の微生物分離装置によれば、微生物を能率よく高い確率で1個ずつに分離できる。また、微生物センサ22は電極部18, 20を用いて微生物を検出しており、従来のフローサイトメトリー装置のように微生物を染色することなく検出することができるので、微生物を生存させたままでも分離することができる。

[0018] 上記実施形態では液滴28を第1流路12の終端から強制的に切り離す手段として加振器26を用いた。しかしながら、本発明に係る液滴分離手段は加振器26に限定されない。例えば、液滴分離手段として加振器26を用いずに閉止しているポンプ34を瞬間的に駆動させてもよい。又は、液滴28に気体を吹き付けて切り離すようにしてもよい。又は、第1流路12に圧電素子を取り付けて第1流路12を瞬間的に圧迫してもよい。

[0019] また、微生物センサ22の微生物の検出結果に基づいて前記第1流路への試料液の供給を停止させる際にポンプ34を停止させたが、ポンプ34の停止に替えて電磁弁38を閉止してもよい。さらに、液滴28を第1流路12の終端から強制的に切り離す際にも、ポンプ34の駆動によって配管36に背圧を作用させた状態で電磁弁38を瞬間的に開閉させてもよい。

[0020] また、上記実施形態では微生物センサ22として、試料液40の電気抵抗を計測する方式のものをを用いた。しかしながら、本発明に係る微生物センサはこれに限らず、第1流路12を通過する微生物を光学的な手段又は誘導電流の変化として検出する方式のものをを用いてもよい。

[0021] さらに、電気抵抗を計測する方式の場合において、直流電源ではなく交流電源を用いても良い。この場合のメリットとしては、通電時の気泡の発生が抑制されることにある。微小な流路では、発生する気泡が流路の大きさと比較して相対的に大きくなり易いために、気泡の抑制は重要である。気泡の発生は、計測精度の低下にも繋がるので、気泡の削減は計測精度の向上に繋がる。また、気泡の発生状態は印加する交流電源の周波数に依存する。周波数を上げると、気泡の発生が徐々に抑制され、1 KHzを越えると気泡の発生はほとんど確認できない。また、印加する交流電源の周

期は、発生シグナルのパルス幅(時間)よりも短くする必要がある。これは、交流電源の周期とシグナルのパルス幅が似ていると、シグナルを認識し難くなるためである。したがって、ローパスフィルター等を利用して電源の波とシグナルの波を分離する必要があるため、電源の周期はシグナルのパルス幅の1/10以下であることが好ましく、さらに、微生物の通過時に発生するシグナルの検出精度を上げるためには1/50以下であることが好ましい。また、交流電源の周期の下限は接続する増幅器や計測器のコストパフォーマンスから、 1×10^{-8} 秒以下であることが好ましい。

[0022] また、第1流路12の終端から滴下する液滴28を複数の受容器52で順次、受ける手段として受容器移動機構50を用いた。しかしながら、この構成に替えて、複数の受容器52を固定位置に配し、第1流路12の終端を順次、各容器の開口に合わせて移動させるようにしてもよい。要するに第1流路12終端の試料液排出部と各受容器52の位置関係が相対的に移動可能とされた関係にあればよい。

[0023] 図2は本発明に係る微生物分離装置の第2実施形態を示す概略構成図である。この微生物分離装置は分離器10aと、この分離器10aに試料液を供給する試料液供給手段30aと、分離器10aの終端側に配置された受容器群50aと、搬送液供給手段60と、洗浄液供給手段71と、吸引手段72とによって構成される。分離器10aには第1流路12aが設けられ、第1流路12aの始端には試料液供給系30aから供給された試料液の流入口14aが形成されている。第1流路12aの終端は先細部16aとされ、この先細部16aには微生物センサ22aが配置されている。微生物センサ22aの検出信号はコントローラ24aに送信される。また、分離器10aには第2流路13が設けられており、第1流路12aの終端が第2流路13の中間に結合している。第2流路13の始端には搬送液供給手段60から供給された搬送液70および、洗浄液供給手段71から供給された洗浄液87の流入口15が形成されている。この第2流路13に搬送液70を流すと、第1流路12aから第2流路13内に吐出された微少量の試料液40aが搬送液70の流れと混合し、混合液29となる。第2流路13の終端には混合液29の流出口17と、この流出口17に接続されたノズル19が設けられている。ノズル19は移動自在とされる。

[0024] 試料液供給手段30aは主に試料液容器32aと、この試料液容器32aと分離器10a

とを結ぶ配管36aと、配管36aの途中に設けたポンプ34aとからなる。ポンプ34aの駆動はコントローラ24aからの信号によって制御される。試料液容器32aには微生物を含む試料液40aが張り込まれている。ポンプ34aの吐出側の配管36aには電磁弁38aとフィルタ39とが取り付けられている。電磁弁38aの開閉はコントローラ24aからの信号によって制御される。フィルタ39は分離目的である微生物よりも大きい微生物や異物を予め試料液40aから除去するために設けられる。このフィルタ39によって第1流路12aの特に先細部16aでの閉塞トラブルを予防することができる。

- [0025] なお、試料液容器32aに張り込む試料液40aは予め分離目的である微生物よりも大きい微生物や異物を別のフィルタでろ過しておくことが好ましい。このようにすれば、フィルタ39で除去する対象物は試料液供給手段30aから新たに発生したものに限られることになり、フィルタ39の負荷を大幅に低減できる。
- [0026] 搬送液供給手段60は主に搬送液容器62と、この搬送液容器62と第2流路13の流入口15とを結ぶ配管66と配管66の途中に設けたポンプ64とからなる。ポンプ64の駆動はコントローラ24aからの信号によって制御される。搬送液容器62には搬送液70が張り込まれている。ポンプ64の吐出側の配管66には電磁弁68が取り付けられている。電磁弁68の開閉はコントローラ24aからの信号によって制御される。
- [0027] 吸引手段72は主に廃液容器94と、この廃液容器94と第一流路12aの鉛直上部に設置された気体排出流路11の流出口27とを結ぶ配管93と、配管93の途中に設けた吸引ポンプ92とからなる。吸引ポンプ92の駆動はコントローラ24aからの信号によって制御される。廃液容器94には気体の排出と同時に排出された廃液が入るようになっている。吸引ポンプ92の吸引側の配管93には電磁弁91が取り付けられている。電磁弁91の開閉はコントローラ24aからの信号によって制御される。
- [0028] 吸引手段72は、第一流路に存在する気泡の除去に使用できる。初期状態の分離器10aは、気体で満たされているため、まず、第一流路12aを液体で満たす必要がある。第一流路12aに気体が存在すると、圧力の変化により圧縮、膨張が起こるために、試料液の正確な駆動制御が難しくなるためである。第一流路12aを液体で満たす手順としては、電磁弁38a, 91を開け、ポンプ34aと必要に応じて吸引ポンプ92を駆動する。すると直ちに、配管36aは試料液40aで満たされることとなる。

- [0029] また、初期の液体充填時には配管36a内に小さな気泡が残存する場合がある。さらに、計測時の通電により、電極部付近に気泡が発生することがある。この気泡を除去するためには、電磁弁38aを閉じ、電磁弁91を開け、吸引ポンプ92を駆動させて、第一流路12a内を負圧にする。このとき流出口17からは外気が入り始めるが、外気が先細部16aを通過する前に電磁弁38aを開放し、必要に応じてポンプ34aを駆動することで、効率よく第一流路12a内の気泡を除去できるようになる。
- [0030] 洗浄液供給手段71は主に搬送液容器86と、この搬送液容器86と第2流路13の流入口15とを結ぶ配管90と、配管90の途中に設けたポンプ88とからなる。ポンプ88の駆動はコントローラ24aからの信号によって制御される。搬送液容器86には洗浄液87が張り込まれている。ポンプ88の吐出側の配管90には電磁弁89が取り付けられている。電磁弁89の開閉はコントローラ24aからの信号によって制御される。
- [0031] 先細部16aには、計測している微生物が付着し、目詰まりを起こすことがある。このときの洗浄方法としては、まず、電磁弁89を開けポンプ88を駆動して洗浄液87を第二流路13に通す。次に、電磁弁91を開け、吸引ポンプ92を駆動することで、先細部16aを洗浄液87が通過するので、さらに洗浄度が高くなる。
- [0032] このとき、洗浄液87としては微生物を溶解できる、ジクロロメタンやトリクロロ酢酸などの有機溶媒や、塩酸や硝酸などの強酸を用いることが好ましい。
- [0033] 第一流路12aに設置されている圧力センサ85は、主にポンプ34aの停止時に使用される。直径5mm以下程度の微小な流路を用いた液体のハンドリングでは、直径5mm以上の太い配管を使用した場合と比較して、圧力変化などによって流路の体積が相対的に変化しやすい。したがって、ポンプ34aを停止した直後は、ポンプ34aと先細部16aの間の流路が膨らんでおり、正圧になっていることがある。したがって、ポンプ34aを停止しても、先細部16aからは、第二流路13に向かって試料液40aが流れ出す場合がある。これを防ぐために、圧力センサ85の計測値をコントローラ24aに伝送し、直ちに測定値が0になるようにポンプ34aを制御する。したがって、ここで言う圧力センサ85は、流量センサに置き換えても目的は達成できる。また、使用する液体によって物性が異なるので、あらかじめそれらの物性を把握し、吸引ポンプ92の適切な運転条件を決定しておけば圧力センサを省略することもできる。さらに、配管93

の断面を先細部16aの断面よりも大きくしておくことで、ポンプ34aの停止直後に電磁弁95を開放するだけで、第一流路12a内の高圧になっている多くの試料液は第二流路13よりも配管93に流れ込む事となる。

[0034] 受容器群50aは複数の受容器52aと廃液容器56及びこれらの容器を並べる受台54aからなる。各筆容器52aと廃液容器56の上端は開口しており、ノズル19から吐出される混合液29を受けることができる。ノズル19は前記したように移動自在であり、任意の受容器52a又は廃液容器56の直上位置に移動して混合液29を目的の容器内に吐出することができる。

[0035] 図6は本発明に係る分離器の第4実施形態を示す概略構成図である。図7は本発明に係る分離器の第5実施形態を示す概略構成図である。この微生物分離装置は、先細部16bの鉛直上部に設置された気体排出流路11bおよび配管93に接続する流出口27と、試料液が流れる第一流路12bおよび配管36aに接続する流入口14bと、主に培地が流れる第二流路13bおよび配管66に接続する流入口15bと、混合液が流出する流出口17bと、第一流路12b内に設置された電極部18bと、第二流路13b内に設置された電極部20bと、電極部18bを含む電極21と電極部20bを含む電極23とで構成される。また、電極部18bと電極部20bは先細部16b先端の流路断面の中心を通る法線上に設置されている。

[0036] 電極部18bと先細部16bと電極部20bを結ぶ距離が最短となる部分が、計測時に流れる電流が多くなる部分である。このため、気泡などによって通電する最短距離が変化してしまうと計測時の抵抗が大きく変化することとなるのでS/N比が低下する。従って、この影響を受けにくくするためには、電極部は線ではなく面もしくはオリフィスを向いた剣山状で有ることが好ましい。さらには、より気泡の影響を受けにくくするために、電極は複数の電極部で構成される、例えば平面で多面体を形成することが好ましく、それぞれの面と先細部16bまでの距離を近似させる設置方法が、より好ましい。さらに好ましくは、電極部を器のような形状とし、電極部上の全ての点から先細部16bまでの距離を近似させることで、微生物の通過時に発生する信号を精度良く計測できるようになる。

[0037] また、電極部と先細部16bまでの距離が長くなると、計測精度が落ちてくるため、好

ましくは10mm以下、さらに好ましくは5mm以下であることが望まれる。

- [0038] さらに、板状の電極部の場合、流路形状が複雑になるので、洗浄度の向上が難しい。従って、二面ある電極部面のうちオリフィス側と反対側は、できる限り密閉し、液体と接しない構造にすることが望ましい。こうすることで、流路形状は簡素になり、洗浄の容易性が向上する。
- [0039] また、第二流路13bは、培地排出時に層流で流れると分離精度が向上する。従って、第二流路の断面の短辺が10mm以下であることが望まれ、好ましくは、5mm以下さらに好ましくは1mm以下であれば、分離精度を向上できる。
- [0040] 吸引手段72は主に廃液容器94と、この廃液容器94と第一流路12aのと、配管93の途中に設けた吸引ポンプ92とからなる。吸引ポンプ92の駆動はコントローラ24aからの信号によって制御される。廃液容器94には気体の排出と同時に排出された廃液が入るようになっている。吸引ポンプ92の吸引側の配管93には電磁弁91が取り付けられている。電磁弁91の開閉はコントローラ24aからの信号によって制御される。
- [0041] 図3は当該装置の動作手順を示すフローチャートである。先ず、電磁弁38aと電磁弁68を開放しておく(S100)。次に、ポンプ34aとポンプ64を稼働させて試料液容器32a内の試料液40aと搬送液容器62内の搬送液70をそれぞれ吸引し、第1流路12aに試料液40aを、第2流路13に搬送液70を満たした状態で、ポンプ34aとポンプ64を停止させておく(S110)。次に、ノズル19を目的の受容器52aの直上位置に移動させる(S120)。次に、ポンプ34aを稼働し第1流路12a内の試料液40aを第2流路13側に吐出させる(S130)。試料液40aは微生物を含んでおり、微生物センサ22aは微生物が先細部16aを通過したことを検知することができる(S140)。微生物センサ22aが微生物を検知しない間は、S130に戻ってポンプ34aによる試料液40aの吐出を継続する。微生物センサ22aが微生物を検知すると直ちにポンプ34aを停止する(S150)。次に、微生物センサ22aは微生物の通過が1回であるか、又は複数回であるかを検証する(S-160)
- 微生物の通過が1回であった時には、まず、ポンプ34aを瞬時的に駆動する(S170)。すると、第1流路12a内の試料液40aが微少量で第2流路13内に吐出する。この微少量の試料液40aには、微生物が1個だけ混入している確率が高い。しかしながら

、S170の操作過程で余分の微生物が微量の試料液40a中に混入する可能性があるので、微生物センサ22aは微生物の通過が1回であるか、又は複数回であるかを再度、検証する(S180)。もし、微生物の通過が複数回であった時には、目的の受容器52aに収容される予定の混合液中には微生物が複数個、混入していることになる。そこで、このエラー情報が出力される(S190)。

[0042] 次に、S180での検証結果に関係なく、ポンプ64を一時的に駆動し、第2流路13内の搬送液70をノズル19側に規定量だけ吐出させる(S200)。その結果、第1流路12aから第2流路13内に吐出された微量の試料液40aが搬送液70の流れと混合する。この混合液29が流出口17を介してノズル19から放出され、目的の受容器52aに収容される。ポンプ64を一時的に駆動する時間は、上記微量の試料液40aが確実に目的の受容器52a内に到達に足る必要最小限であることが好ましい。以上のS120～S200の操作によって1回の微生物分離操作が完了する。次いで、S120に戻り、同様の微生物分離操作を繰り返す。混合液29をそれぞれ収容した複数の受容器52aの中には、前記S190でエラー情報が出力されたものが含まれている。したがって、エラー情報が出力された受容器52aの混合液29は有用性が低いので通常は廃棄処分される。

[0043] 前記S160での微生物センサ22aによる検証において、微生物の通過が複数回であった時には、ノズル19を廃液容器56の直上位置に移動させる(S210)。ポンプ64を一時的に駆動し、第2流路13内の搬送液70をノズル19側に規定量だけ吐出させる(S220)。このS220は前記したS200と同様の操作であり、2個以上の微生物を含んだ不要の混合液29が流出口17を介してノズル19から放出され、廃液容器56に収容される。次に、ノズル19が目的の受容器52aが存在する元位置に移動する(S230)。その後、直ちにS130に戻り、再び一連の分離操作が繰り返される。

[0044] なお、上記の動作手順において、S130、S150、S170、S200、S220の操作では、ポンプ34aやポンプ64の駆動、停止によって各液の吐出を制御するようにした。しかしながら、ポンプ34aやポンプ64の駆動、停止に替えて、これらのポンプを常時駆動させて各流路に背圧を作用させた状態で電磁弁38a又は電磁弁68の開閉によって各液の吐出を制御するようにしてもよい。

- [0045] また、上記第2実施形態では複数の受容器52aや廃液容器56を固定位置に配し、ノズル19を各容器の開口に合わせて移動させている。しかしながら、これとは逆に、前記第1実施形態と同様に受容器52aや廃液容器56を移動機構によって任意に移動可能とし、固定位置のノズル19に合わせて目的の移動を実行させるようにしてもよい。
- [0046] 図4は第2実施形態における第1流路12aと第2流路13aの結合部の詳細図であり、図4(1)は図2と同様の側面図、図4(2)は図4(1)のA-A矢視図である。第1流路12aの先細部16aの第2流路13aに対する開口形状は長方形とされている。そして、この長方形は第2流路13a内を流れる搬送液70の進行方向の長さよりも、進行方向と垂直な方向の長さが長い。先細部16aの開口形状がこのような長方形であるため、図3に示したS-200において、ポンプ64を一時的に駆動し、第2流路13内の搬送液70をノズル19側に規定量だけ吐出させた際に、第2流路13内に押し出されていた試料液40a中の微生物が先細部16aの開口から第1流路12aの側に逆流する可能性が低くなる。このため、当該微生物を搬送液70によって確実にノズル19に送り込むことができる。
- [0047] 図5は本発明に係る微生物分離装置の第3実施形態を示す概略構成図である。当該微生物分離装置は第2実施形態に示した分離器10aと同様の構成であり、第1流路12bと第2流路13bと流出口17bとを備えた分離器10bを有している。流出口17bには混合液の排出配管80が接続されている。排出配管80は複数本の分岐管82に分岐しており、各分岐管82には切替弁84が取り付けられている。また、各分岐管82の下流側には受容器52bが配されている。
- [0048] この第3実施形態では、微生物を含む混合液が流出口17bから排出配管80に流れてくると、目的の受容器52bに対応した分岐管82の切替弁84のみを開放し、その他の切替弁84を閉止しておく。このようにして、微生物を1個ずつ別個の受容器52bに振り分けて収容することができる。この実施形態によれば、切替弁84の開閉を制御するだけで微生物分離を実施できるので、第1又は第2実施形態に示した受容器又はノズルの移動機構を必要としない利点がある。
- [0049] また、前記各実施形態では、1つの受容器に微生物を1個ずつ収容する場合につ

いて説明した。しかしながら、本発明に係る微生物分離装置は種類の異なる微生物を、それぞれの種類別に分離する場合にも適用することができる。すなわち、試料液中に種類の異なる複数の微生物が存在している場合、一般に微生物は種類別にそのめ大きさや形状が異なる。したがって、前記した微生物センサが微生物を種類毎に識別できる機能を備えている場合には、その識別結果に基づいて同一種の微生物を専用の受容器にまとめて複数個收容することができる。このような分離方法を採用すると、準備する受容器の数を大幅に節減できるという利点がある。さらに、目的とする微生物のみを専用の受容器に收容し、目的外の微生物はすべて廃液処分とすることができるので、合目的の微生物分離を行うことができる。

産業上の利用可能性

- [0050] 本発明に係る微生物分離装置を用いて分離した微生物を培養すれば容易に当該微生物を単離することができ、当該微生物の能力を評価できるとともに各種産業用として効果的に利用することができる。

図面の簡単な説明

- [0051] [図1]本発明に係る微生物分離装置の第1実施形態を示す概略構成図である。
[図2]本発明に係る微生物分離装置の第2実施形態を示す概略構成図である。
[図3]第2実施形態の微生物分離装置の動作手順を示すフローチャートである。
[図4]第2実施形態における第1流路12aと第2流路13aの結合部の詳細図であり、図4(1)は図2と同様の側面図、図4(2)は図4(1)のA-A矢視図である。
[図5]本発明に係る微生物分離装置の第3実施形態を示す概略構成図である。
[図6]本発明に係る微生物分離装置の第4実施形態を示す概略構成図である。
[図7]本発明に係る微生物分離装置の第5実施形態を示す概略構成図である。

符号の説明

- [0052] 10, 10a, 10b…分離器、12, 12a, 12b…第1流路、13…第2流路、14, 14a…流入口、16, 16a…先細部、18, 20…電極部、19…ノズル、22, 22a…微生物センサ、24, 24a…コントローラ、26…加振器、28…液滴、30, 30a…試料液供給手段、32, 32a…試料液容器、34, 34a…ポンプ、38, 38a…電磁弁、40, 40a…試料液、50…受容器移動機構、52, 52a, 52b…受容器、54, 54a…受台、56…廃液容

器、60…搬送液供給手段、62…搬送液容器、64…ポンプ、68…電磁弁、80…排出配管、82…分岐管、84…切替弁。

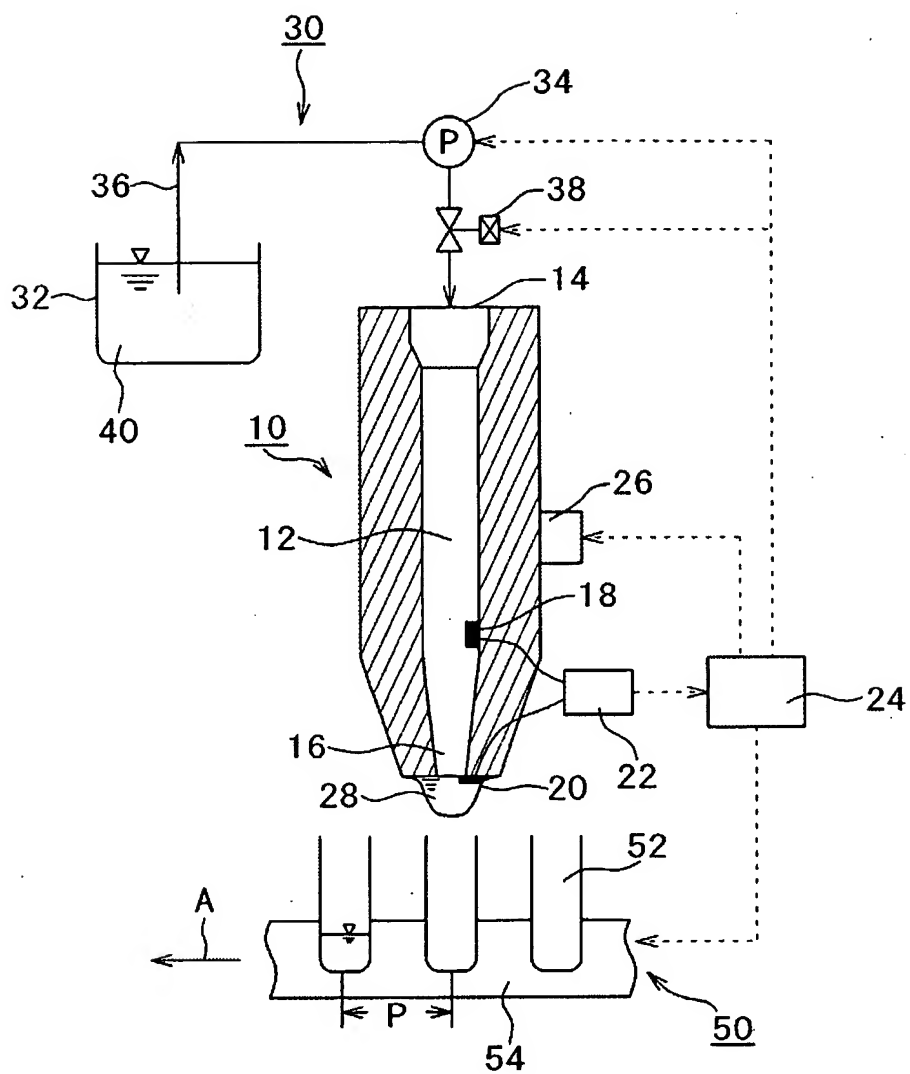
請求の範囲

- [1] 微生物を含む試料液を収容した試料液容器と、前記試料液容器内の試料液を第1流路に供給する試料液供給手段と、前記第1流路を通過する前記試料液中の単体の微生物を検出可能な微生物センサと、前記微生物センサの微生物の検出結果に基づいて前記第1流路への試料液の供給を停止させた後に前記検出した微生物を試料液とともに前記第1流路の終端側から排出させる試料液分離手段と、前記第1流路の終端側から排出される試料液を受ける受容器とを備えたことを特徴とする微生物分離装置。
- [2] 前記第1流路の終端側から排出される試料液が1個の微生物を含むように前記試料液分離手段が制御可能とされたことを特徴とする請求項1に記載の微生物分離装置。
- [3] 前記第1流路の終端を第2流路の中間に結合し、前記第2流路に前記第1流路の終端側から排出された試料液を搬送するための搬送液を流通可能にするとともに、前記受容器を第2流路の終端側に配置したことを特徴とする請求項1又は請求項2に記載の微生物分離装置。
- [4] 前記試料液供給手段にフィルタを設置したことを特徴とする請求項1乃至請求項3のいずれかに記載の微生物分離装置。
- [5] 前記受容器を複数個有し、前記第1流路又は第2流路の終端の試料液排出部と各受容器の位置関係が相対的に移動可能とされたことを特徴とする請求項1乃至請求項4のいずれかに記載の微生物分離装置。
- [6] 前記第2流路の下流側が複数の分岐管に分かれており、各分岐管の下流に前記受容器が配置されたことを特徴とする請求項3又は請求項4に記載の微生物分離装置。
- [7] 微生物を含む試料液を第1流路に注入する試料液供給手段と、余分な試料液や気泡を排出する第1排出口と、搬送液を第2流路に注入する搬送液供給手段と、微生物と共に搬送液が排出される第2排出口が存在し、第1流路と第2流路がオリフィスを通して接続されており、第1流路と第2流路のそれぞれに設置された1対の電極で微生物のオリフィスの通過を検知できることを特徴とする微生物分離装置。

- [8] 微生物センサを構成する第一流路に設けた電極と第二流路に設けた電極において、それぞれの電極がオリフィスの中心を通る法線上にあることを特徴とする請求項7に記載の微生物分離装置。
- [9] 微生物センサを構成する第一流路に設けた電極と第二流路にある電極のうち、少なくとも一方の電極が複数の面で構成されており、それぞれの面を通る法線がオリフィスを通るように設置された事を特徴とする請求項7に記載の微生物分離装置。
- [10] 微生物センサを構成する第一流路に設けた電極と第二流路にある電極のうち、少なくとも一方の電極が、オリフィスの中心を中心とする球上に存在することを特徴とする請求項7に記載の微生物分離装置。
- [11] 前記微生物分離装置において、第一流路に、圧力または流量を計測するセンサを備えることを特徴とする請求項1乃至請求項8のいずれかに記載の微生物分離装置。
。
- [12] 前記微生物分離装置において、センサに印加する電源を交流にすることを特徴とする請求項1乃至請求項9のいずれかに記載の微生物分離装置。

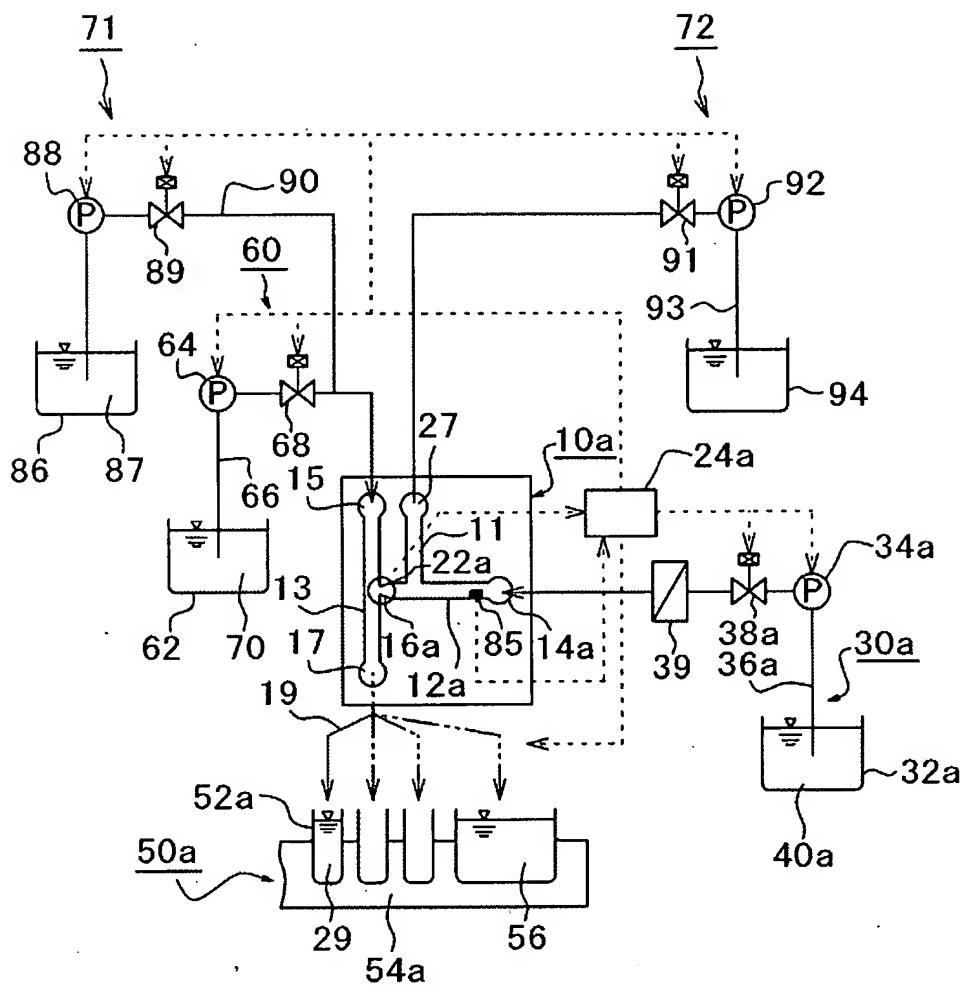
[図1]

図 1



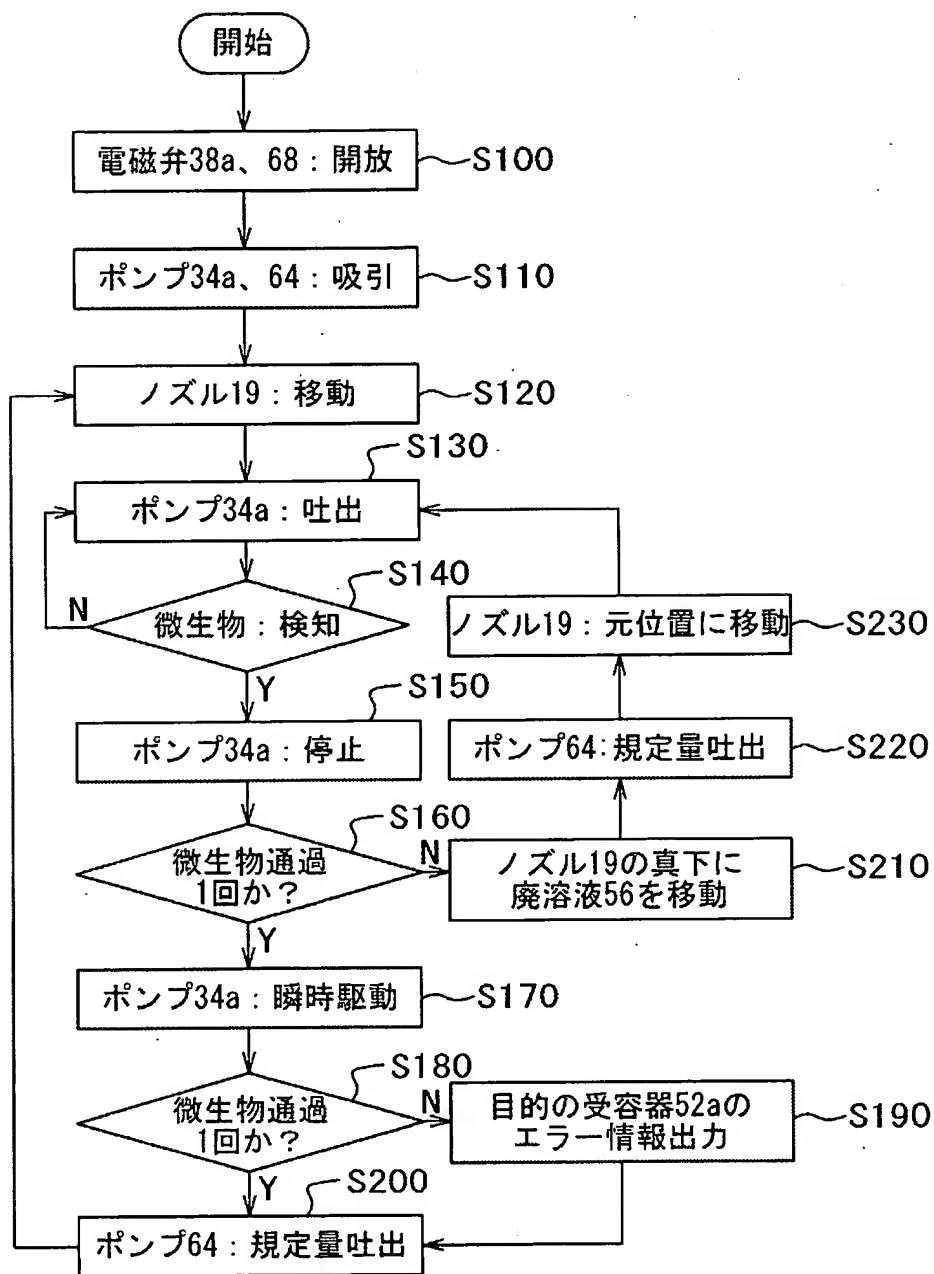
[図2]

図 2



[図3]

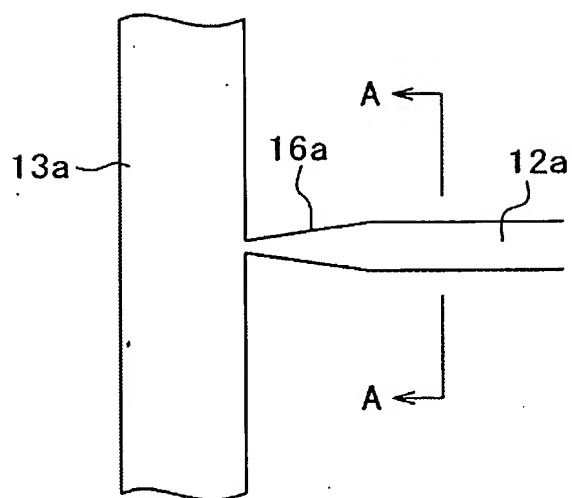
図 3



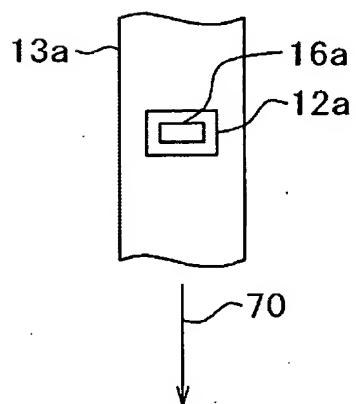
[図4]

図 4

(1)

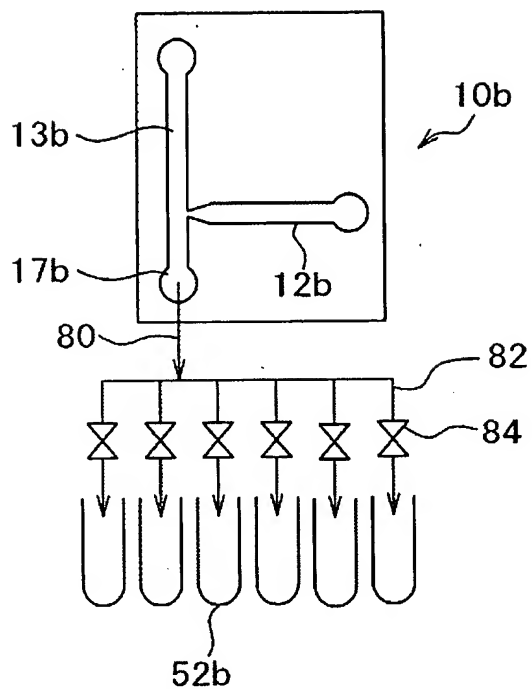


(2)



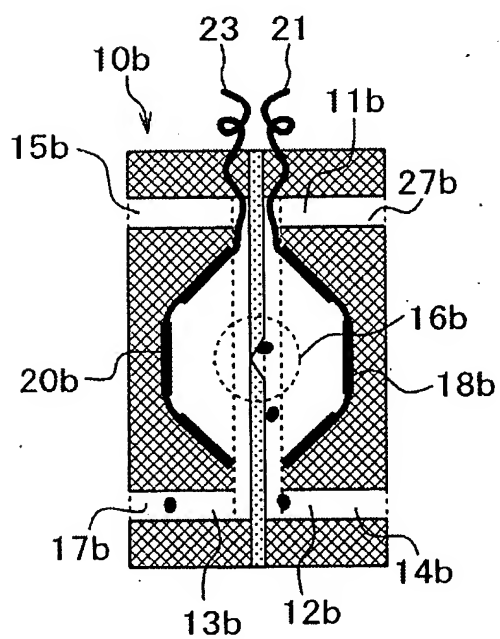
[図5]

図 5



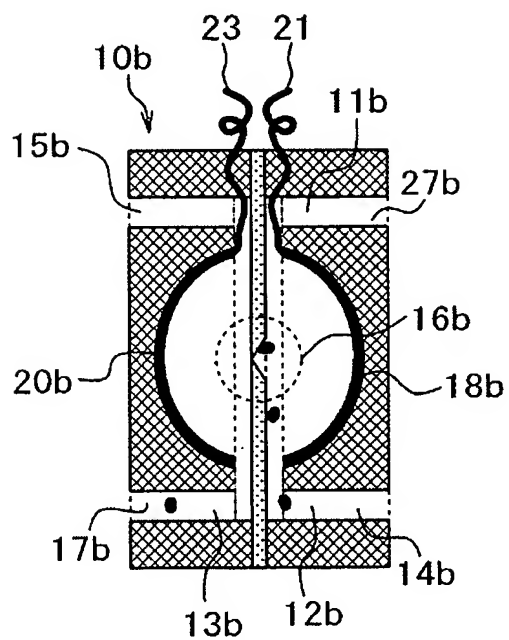
[図6]

図 6



[図7]

图 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000690

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N1/00, C12M1/00, G01N1/28, 15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N1/00, C12M1/00, G01N1/28, 15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), BIOSIS/WPI (DIALOG), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	JP 9-145593 A (Nikon Corp.), 06 June, 1997 (06.06.97), Full text (Family: none)	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12
<u>Y</u> A	JP 2000-74816 A (Nireco Corp.), 14 March, 2000 (14.03.00), Full text (Family: none)	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12
<u>Y</u> A	JP 2003-284544 A (Aisin Seiki Co., Ltd.), 07 October, 2003 (07.10.03), Full text (Family: none)	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 April, 2005 (14.04.05)

Date of mailing of the international search report
10 May, 2005 (10.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000690

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	JP 2003-274924 A (Jun KIKUCHI), 30 September, 2003 (30.09.03), Full text (Family: none)	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12
<u>Y</u> A	Fu A.Y. et al., An integrated microfabricated cell sorter, Anal.Chem., 2002, Vol.74, pages 2451 to 2457	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12
<u>Y</u> A	Fu A.Y. et al., A microfabricated fluorescence- activated cell sorter, Nat.Biotechnol., 1999, Vol.17, pages 1109 to 1111	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12
<u>Y</u> A	JP 11-281564 A (Sysmex Corp.), 15 October, 1999 (15.10.99), Full text (Family: none)	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12
<u>Y</u> A	JP 2001-305041 A (Sysmex Corp.), 31 October, 2001 (31.10.01), Full text & US 2001/0032495 A1	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000690

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions in Claims 1-6 and a part of the inventions in Claims 11 and 12 (invention group A) relate to a microorganism separation device having a specimen liquid separation means for discharging detected microorganisms together with a specimen liquid from the terminal side of the first flow passage after the supply of the specimen liquid to the first flow passage is stopped based on the detected results on the microorganisms by a microorganism sensor.

The inventions in Claims 7-10 and a part of the inventions in Claims 11

(continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000690

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

and 12 (invention group B) relate to a microorganism separation device in which a first flow passage is connected to a second flow passage through an orifice and the passing of the microorganisms through the orifice can be detected by a pair of electrodes installed in the first and second flow passages.

A common matter pertaining to the invention group A and the invention group B relates to a microorganism separation device having a specimen supply means, a first flow passage, and a sensor capable of detecting microorganisms. However, as described in JP 9-1455693 A, the common matter was publicly known before the priority date of this application. Accordingly, the common matter is not a special technical feature in the meaning of the second sentence of PCT Rule 13.2.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N1/00, C12M1/00, G01N1/28, 15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N1/00, C12M1/00, G01N1/28, 15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST ファイル(JOIS), BIOSIS/WPI(DIALOG), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	JP 9-145593 A (株式会社ニコン) 1997.06.06, 全文 (ファミリーなし)	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12
<u>Y</u> A	JP 2000-74816 A (株式会社ニレコ) 2000.03.14, 全文 (ファミリーなし)	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12
<u>Y</u> A	JP 2003-284544 A (アイシン精機株式会社) 2003.10.07, 全文 (ファミリーなし)	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.04.2005

国際調査報告の発送日

10.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3227

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	JP 2003-274924 a (菊地 純) 2003.09.30, 全文 (ファミリーなし)	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12
<u>Y</u> A	Fu A.Y. et al., An integrated microfabricated cell sorter, Anal. Chem., 2002, Vol. 74, p. 2451-2457	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12
<u>Y</u> A	Fu A.Y. et al., A microfabricated fluorescence-activated cell sorter, Nat. Biotechnol., 1999, vol. 17, p. 1109-1111	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12
<u>Y</u> A	JP 11-281564 A (シスメックス株式会社) 1999.10.15, 全文 (ファミリーなし)	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12
<u>Y</u> A	JP 2001-305041 A (シスメックス株式会社) 2001.10.31, 全文 & US2001/0032495 A1	<u>7-10</u> 1-6, 11, 12

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-6に係る発明と請求の範囲11、12に係る発明の一部(発明群A)は、微生物センサの微生物の検出結果に基づいて第1流路への試料液の供給を停止させた後に前記検出した微生物を試料液とともに前記第1流路の終端側から排出させる試料液分離手段を備える微生物分離装置に関するものである。請求の範囲7-10に係る発明と請求の範囲11、12に係る発明の一部(発明群B)は、第1流路と第2流路がオリフィスを通して接続されており、第1流路と第2流路のそれぞれに設置された一対の電極で微生物のオリフィスの通過を検知できる微生物分離装置に関するものである。

発明群Aと発明群Bに共通の事項は、試料供給手段、第1流路、微生物を検出できるセンサを有する微生物分離装置に関するものであることである。しかしながら、JP 9-145593 Aに記載されているように、当該事項は本願優先日前に公知であったので、PCT規則13.2の第2文の意味において、この共通事項は特別な技術的特徴ではない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。